

明細書

肝細胞前駆細胞の分離方法

発明の背景

発明の分野

[0001]本発明は、多能性を有する肝細胞前駆細胞の同定方法、該多能性を有する肝細胞前駆細胞の分離方法及び該多能性肝細胞前駆細胞の製造方法に関する。

関連技術の記載

[0002]肝臓は、非常に再生能の高い臓器として知られているが、近年の細胞生物学の進展によって、幹細胞システムに基づいてその恒常性が制御されている事が明らかになりつつある。肝臓の幹細胞を同定、分離する技術は肝臓の再生治療を実現する上で重要なテクノロジーである。

[0003]近年、フローサイトメトリー等細胞分離技術の発達に伴って幹細胞の分離法が開発されている。特に、造血系幹細胞に関しては、細胞表面のさまざまな抗原を利用した分離法が開発されており、分離された一つの細胞から骨髓が再構築された例も報告されている。

[0004]肝臓の幹細胞の候補としては、オーバル細胞 (o v a l c e l l)、肝芽細胞、骨髓由来細胞等が考えられている。これらの細胞はいずれも肝細胞に分化することができ、肝障害の病態に関与しているものと考えられる。肝臓の幹細胞（又は幹細胞様細胞）の分離においても、前述したようなフローサイトメトリーを用いた方法が導入され、肝臓中にわずかしき存在しないうえに、形態的に区別できない幹細胞（又は幹細胞様細胞）を選択的に分離し、回収する方法が考案されている。例えば谷口らは、マウス胎仔肝臓中の非血球細胞画分 (CD45⁻Ter119⁻細胞) に存在する c - M e t ⁺CD49 f ^{+/low}c - K i t ⁻CD45⁻Ter119⁻細胞を、各抗原に特異的

な蛍光標識抗体を用いてフローサイトメトリーによって分離し、この細胞画分中に増殖能が高く、かつ肝細胞と胆管細胞の二種類の異なった細胞に分化可能な多分化能を持っている細胞が含まれていることを報告している〔例えば、ザ ジャーナル オブ セル バイオロジー (The Journal of Cell Biology)、第156巻、第173-184頁(2002年)参照〕。あるいは、フェリス〔例えば、特表2002-520015号(国際公開第00/03001号パンフレット参照)〕、ラミニン、デスモブラキンI、細胞間接着分子(CCAM)、ガン胎児性抗原(CEA)、ジペプチジルペプチダーゼ-4、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(gGT)、VLA-2、VLA-3、VLA-5及びVLA-6からなる群より選択される抗原を発現する細胞を選択する工程を含む、肝実質細胞から肝幹細胞を分離する方法を報告している。

[0005]しかしながら、肝臓の幹細胞に関する確実な定義がなされておらず、前記肝臓の幹細胞の候補となる細胞が見出されているに過ぎず、また幹細胞から成熟細胞に分化していく各段階で、どのような細胞表面抗原が発現しているのかについて十分には解析されていないのが現状である。

[0006]一方、糖鎖は、糖タンパク質や糖脂質の形で細胞表面に分布し、細胞同士あるいは細胞と細胞外マトリックスとの相互作用や細胞内シグナリング、タンパク質のターゲティングに重要な役割を果たしている。近年糖鎖の生合成に関与する糖転移酵素が多数クローニングされ、糖鎖の生物学的機能に関する情報が蓄積されつつある。

発明の簡単な要旨

[0007]本発明は、1つの側面では、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖を検出する、多能性を有する肝細胞前駆細胞の同定方法を提供することに関する。本発明の同定方法により、種々の細胞を含む細胞集団中において、例えば、肝臓を構成する細胞、具体的には、例えば、肝細胞、肝非実質細胞等への分化能を少なくとも有する細胞、

すなわち、多能性を有する肝細胞前駆細胞を同定すること、種々の細胞を含む細胞集団から、該肝細胞前駆細胞を効率よく分離すること、多能性を有する肝細胞前駆細胞の純度を向上させること等の少なくとも1つが可能になる。

[0008]本発明は、他の側面では、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖を指標として、多能性を有する肝細胞前駆細胞を選択する、多能性を有する肝細胞前駆細胞の分離方法を提供することにある。本発明の分離方法により、種々の細胞を含む細胞集団から、多能性を有する肝細胞前駆細胞を分離すること、高純度の多能性を有する肝細胞前駆細胞を得ること、安定した品質の多能性を有する肝細胞前駆細胞を得ること等の少なくとも1つが可能になる。

[0009]本発明は、さらに他の側面では、前記同定方法により、多能性肝細胞前駆細胞を分離するステップを含む、多能性肝細胞前駆細胞含有組成物の製造方法を提供することに関する。本発明の製造方法によれば、細胞移植による組織再生、核酸分子、遺伝子、例えば、治療用遺伝子、それらの誘導体等の *ex vivo* での導入、移植用組織の生産、研究用途等のいずれかへの応用に適した多能性肝細胞前駆細胞含有組成物を得ること、多能性肝細胞前駆細胞を高純度で含有した組成物を得ること等の少なくとも1つが可能になる。

[0010]本発明は、例えば、

〔1〕 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖を検出する、多能性を有する肝細胞前駆細胞の同定方法、

〔2〕 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合するタンパク質を用いて、該糖鎖を検出する、前記〔1〕記載の方法、

〔3〕 該タンパク質が、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合するレクチンである、前記〔2〕記載の方法、

〔4〕 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖が、インゲンマメレクチン、小麦胚レクチン、レンズマメレクチン及びヒイロチャワンタケレクチンからなる群より選択された少なくとも1つのレクチンによって認識される糖鎖構造を含むものである、前記

〔1〕記載の方法、

- 〔５〕 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合する抗体を用いて、該糖鎖を検出する、前記〔１〕記載の方法、
- 〔６〕 該糖鎖を、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖の合成に関与する酵素の発現を介して、検出する、前記〔１〕記載の方法、
- 〔７〕 酵素の発現が、酵素活性の測定、酵素タンパク質量の測定及び酵素をコードする遺伝子由来のmRNA量の測定からなる群より選択された少なくとも１つの手段により検出される、前記〔６〕記載の方法、
- 〔８〕 該酵素が、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼⅠⅠⅠ、シアリルトランスフェラーゼ又は α -1, 6フコシルトランスフェラーゼである、前記〔６〕記載の方法、
- 〔９〕 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖を指標として、多能性を有する肝細胞前駆細胞を選択する、多能性を有する肝細胞前駆細胞の分離方法、
- 〔１０〕 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合するタンパク質を用いて、多能性を有する肝細胞前駆細胞を選択する、前記〔９〕記載の方法、
- 〔１１〕 該タンパク質が、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合するレクチンである、前記〔１０〕記載の方法、
- 〔１２〕 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖が、インゲンマメレクチン、小麦胚レクチン、レンズマメレクチン及びヒイロチャワンタケレクチンからなる群より選択された少なくとも１つのレクチンによって認識される糖鎖構造を含む、前記〔１０〕記載の方法、
- 〔１３〕 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合する抗体を用いて、多能性を有する肝細胞前駆細胞を選択する、前記〔９〕記載の方法、並びに
- 〔１４〕 前記〔９〕～〔１３〕いずれか１項に記載の方法により、多能性肝細胞前駆細胞を分離するステップを含む、多能性肝細胞前駆細胞含有組成物の製造方法、に関する。

図面の簡単な説明

[0011]図 1 は、本発明における、F I T C 標識 E 4 P H A を用いた F A C S の結果である。

[0012]図 2 は、本発明における、F I T C 標識 L C A を用いた F A C S の結果である。

発明の詳細な説明

[0013]本発明によれば、肝臓細胞の未分化細胞から成熟細胞に分化する過程における細胞表面糖鎖の構造変化や糖転移酵素活性あるいは遺伝子発現を解析し、多能性を有する肝細胞前駆細胞に特異的な細胞表面糖鎖マーカーを同定し、この糖鎖マーカーにより、肝幹細胞（又は肝幹細胞様細胞）、すなわち、肝細胞前駆細胞を得る手段が提供されうる。

[0014]本発明は、多能性を有する肝細胞前駆細胞、具体的には、細胞表面の糖タンパク質が、インゲンマメレクチン（E 4 P H A）、小麦胚レクチン（W G A）、レンズマメレクチン（L C A）、あるいはヒヨロチャワンタケレクチン（A A L）との反応性が特異的に高く、初代培養肝細胞や肝癌細胞由来の糖タンパク質と大きく異なるという本発明者らにより見出された驚くべき知見に基づく。さらに、本発明は、前記糖タンパク質、具体的には、細胞表面糖鎖抗原をマーカーとして、多能性を有する肝細胞前駆細胞を同定し、フローサイトメトリー等の細胞分離技術を用いて当該細胞を分離することができるという本発明者等の驚くべき知見に基づく。

[0015]本発明の 1 つの側面は、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖を検出する、多能性を有する肝細胞前駆細胞の同定方法である。

[0016]本発明の他の側面は、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖を指標として、多能性を有する肝細胞前駆細胞を選択する、多能性を有する肝細胞前駆細胞の分離方法である。

[0017]本発明の同定方法によれば、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖を検出するため、種々の細胞を含む細胞集団から、多能性を有する肝細胞前駆細胞を、より効率よく、高い特異性で同定することができるという優れた効果を発揮する。さらに、本発明の同定方法によれば、前記糖鎖が指標として用いられているため、糖鎖に特異的に結合若しくは会合する因子又は該糖鎖に関連する事象により、多能性を有する肝細胞前駆細胞を同定することができるという優れた効果を発揮する。したがって、本発明の同定方法によれば、多能性を有する肝細胞前駆細胞の純度の向上、純度の評価等が可能になる。また、本発明の同定方法は、肝臓に対する、移植又は遺伝子治療用の細胞の品質の評価にも有用である。

[0018]また、本発明の分離方法によれば、多能性を有する肝細胞前駆細胞を選択するに際して、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖が、指標として用いられているため、種々の細胞を含む細胞集団から、多能性を有する肝細胞前駆細胞を、より効率よく、より高い特異性で分離することができるという優れた効果を発揮する。したがって、本発明の分離方法によれば、安定した品質の多能性を有する肝細胞前駆細胞を得ることができる。そのため、本発明の分離方法により分離された肝細胞前駆細胞は、細胞移植による組織再生；核酸分子、遺伝子、例えば、治療用遺伝子、それらの誘導体等の *ex vivo* での導入；移植用組織の生産等を利用した場合、実質的に均質な組織の再生が可能になり、実質的に均質な治療効果を付与することができ、より安定した品質の移植用組織を供給することが可能になる。

[0019]本発明における「多能性を有する肝細胞前駆細胞 (multipotent hepatocyte precursor cell)」とは、肝臓において異なった機能をもつ複数種の成熟細胞に分化することのできる多分化能と自己と同じ細胞を複製できる自己複製能とを兼ね備えた細胞をいう。前記「多能性を有する肝細胞前駆細胞」には、長寿又は不死の性質をさらに有する細胞も含まれる。

[0020]前記「多能性を有する肝細胞前駆細胞」としては、例えば、肝臓を構成する細胞集団の中で最も未分化な細胞であり、肝臓における多分化能を有する細胞等が挙げ

られる。かかる細胞の候補としては、例えば、胆管上皮細胞と肝細胞とに分化可能なオーバル細胞と呼ばれる前駆細胞等が挙げられる。また、前記「多能性を有する肝細胞前駆細胞」の概念には、門脈周囲領域に存在しうる、より未分化で多分化能を有する細胞も含まれる。さらに、前記「多能性を有する肝細胞前駆細胞」の概念には、骨髓細胞や末梢血中に存在しうる、肝細胞に分化可能な幹細胞も含まれる。本発明の多能性を有する肝細胞前駆細胞の同定方法及び分離方法は、これらの未分化で多能性を有する肝細胞前駆細胞候補に好適に適用される。

[0021]多能性を有する肝細胞前駆細胞を分離するための材料としては、当該細胞を含むことが予想される器官、組織等であれば特に限定はなく、例えば、成体肝臓組織、胎生肝臓組織、骨髓組織、血液細胞、骨髓細胞、末梢血液細胞等が挙げられる。さらに、本発明の肝細胞前駆細胞の同定方法又は分離方法によれば、既存の細胞分画法によって分画された細胞群、慣用の分化方法により得られた細胞群等に対して適用することによって、より未分化で多分化能を有する細胞を分離することができる。

[0022]前記「多能性を有する肝細胞前駆細胞を分離するための材料」の供給源は、使用用途に応じて、適宜選択できるが、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、サル、チンパンジー等の霊長類動物、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、イヌ等）等が挙げられる。

[0023]本発明の多能性を有する肝細胞前駆細胞の同定方法及び分離方法においては、前記したように、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に特異的に結合若しくは会合する因子又は該糖鎖に関連する事象を介して、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現（又は存在）する糖鎖を検出することができる。

[0024]前記糖鎖に特異的に結合若しくは会合する因子としては、例えば、該糖鎖に結合若しくは会合するタンパク質、該糖鎖に結合する抗体（糖鎖に対する抗体）等が挙げられる。

[0025]本発明の同定方法は、1つの実施態様では、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合するタンパク質を用いて、該糖鎖を検出する。かかる実施態様の同定方法は、具体的には、

(A) 前記「多能性を有する肝細胞前駆細胞を分離するための材料」と、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合するタンパク質とを接触させるステップ、及び

(B) 前記ステップ(A)で得られた混合物中において、該タンパク質が結合した細胞を検出するステップ、

を含むプロセスを行ない、該タンパク質が結合した細胞を、多能性を有する肝細胞前駆細胞として同定する。

[0026]また、本発明の分離方法は、1つの実施態様では、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合するタンパク質を用いて、多能性を有する肝細胞前駆細胞を選択する。かかる実施態様の分離方法は、具体的には、

(a) 前記「多能性を有する肝細胞前駆細胞を分離するための材料」と、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合するタンパク質とを接触させるステップ、及び

(b) 前記ステップ(a)で得られた混合物中において、該タンパク質が結合した細胞を選別し、分離するステップ、

を含むプロセスを行ない、該タンパク質が結合した細胞を、多能性を有する肝細胞前駆細胞として選別する。

[0027]前記糖鎖に結合若しくは会合するタンパク質として、例えば、レクチンを用いることができる。レクチンは、免疫反応産物以外の糖結合性タンパク質あるいは糖タンパク質で細胞又は複合糖質を凝集することができるものと定義される。前記レクチンは、植物性レクチンと動物性レクチンとがある。本発明に用いられるレクチンとしては、多能性を有する肝細胞前駆細胞表面に発現(又は存在)する糖鎖に反応(例えば、「結合」又は「会合」も含む)するものであれば、特に限定されるものではない。本発明においては、前記細胞において特異的に発現している糖鎖に反応するレクチンが特に好適に使用される。また、認識する糖鎖構造(oligosaccharide structure)が詳細に調べられた種々のレクチンが糖鎖構造研究用に市販されており、これらのレクチ

ンを本発明に好適に用いることができる。前記レクチンとしては、例えば、L-フコース結合性レクチン；D-ガラクトース、N-アセチル-D-ガラクトサミン結合性レクチン；D-マンノース結合性レクチン；ジ-N-アアエチルキトビオース結合性レクチン；シアル酸結合性レクチン等が挙げられる。これらのレクチンの糖鎖認識特性に関しては、例えば、2002年、アカデミック・プレス社（Academic Press, Inc.）発行、ウィリアム・J・レナーツ（William J. Lennarz）、ジェラルド・W・ハート（Gerald W. Hart）編集、メソッズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology）、第230巻、第66-86頁や新生化学実験講座3、糖質I、糖タンパク質（上）、第3-29頁に詳しく記載されている。

[0028]本発明の同定方法及び分離方法に用いられうることが見出されたレクチンとしては、例えば、インゲンマメレクチン、小麦胚レクチン、レンズマメレクチン、ヒヨロチャワンタケレクチン等が挙げられる。インゲンマメレクチンは、慣用名がE4PHAであり、バイセクティングGlcNAc構造をもつコンプレックス型糖鎖構造を認識して結合することが知られている。小麦胚レクチンは、慣用名がWGAであり、シアル酸及び／又はバイセクティングGlcNAc構造をもつハイブリッド型あるいはコンプレックス型糖鎖構造を認識して結合する。レンズマメ（レンチル）レクチンは、慣用名がLCAであり、例えば、2本鎖コンプレックス型糖鎖で還元末端に位置するN-アセチルグルコサミン残基に α -L-フコース残基が結合した構造の糖鎖をもつ糖ペプチドや糖タンパク質、あるいは3本鎖コンプレックス型糖鎖で α -D-マンノース残基のC-2, 6で分岐した構造の糖鎖をもつ糖ペプチドや糖タンパク質に強い親和性を有する。ヒヨロチャワンタケレクチンは、慣用名がAALであり、フコース残基に特異的なレクチンで、 α -1, 2及び α -1, 3-L-フコース残基に対しても結合するが、特に α -1, 6-L-フコース残基をもつ糖鎖に対して強い親和性を有する。

[0029]本発明において、レクチンは、そのまま又は各種標識物質（例えば、FIT

C等の蛍光物質、パーオキシダーゼ等の酵素、ビオチン等)により標識したレクチンを用いることができる。また、本発明においては、複数種のレクチンを組み合わせて使用することもできる。

[0030]なお、本発明の同定方法において、レクチンを指標として、多能性を有する肝細胞前駆細胞を同定するためには、例えば、レクチンブロッティング法、レクチンカラム法、標識レクチンによる細胞染色法、標識レクチンを用いたフローサイトメトリー等の方法が用いられる。これらの方法の詳細については、例えば、1996年、秀潤社発行、グライコバイオロジー実験プロトコール、細胞工学別冊、実験プロトコールシリーズや1999年、医歯薬出版株式会社発行、日本電気泳動学会編集、最新電気泳動実験法等に記載されている。

[0031]レクチンブロッティングについては、例えば、以下のように行なわれうる。分析対象の細胞を、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) で1回洗浄後、TNEバッファー (組成: 1重量% NP-40と0.15M NaClと、1mM EDTAとプロテアーゼインヒビターカクテル (シグマ社製) を含む10mM Tris塩酸、pH 7.8) で溶解させ、細胞溶解物を得る。8~12重量% SDS-ポリアクリルアミドゲルで3~25 μ gのタンパク質量に相当する前記細胞溶解物を電気泳動後、分離された物質をニトロセルロース膜にエレクトロブロッティングする。ブロッティング終了後、得られた膜を、3重量% BSA (ウシ血清アルブミン) 中で室温、一晚インキュベーションして、ブロッキングを行なう。標識レクチン、例えば、ビオチン化レクチンを、0.05重量% Tween 20 (商品名) を含むTBS (トリス緩衝生理食塩水) に溶解した溶液中で、前記ニトロセルロース膜を室温で30分から2時間、あるいは4℃で数時間から一晚インキュベーションする。前記ビオチン化レクチンは、特に限定されないが、例えば、レクチンを慣用の方法で標識物質、例えば、ビオチンにより標識し作製されたものであってもよく、例えば、生化学工業株式会社から市販されているものであってもよい。前記標識レクチン、例えば、ビオチン化レクチンとのインキュベーション後の膜を、0.05重量% Tween 20 (商品

名)を含むTBSで10分間、3回洗浄する。その後、パーオキシダーゼ標識アビジンを、0.05重量% Tween 20 (商品名)を含むTBSで適当に希釈した液に洗浄後の膜を浸して室温で30分から2時間インキュベーションする。得られた膜を、0.05重量% Tween 20 (商品名)を含むTBSで10分間、3回洗浄する。ついで、標識に用いられた標識物質に応じた慣用の方法で、膜上の糖タンパク質に結合しているレクチンを検出する。例えば、前記ビオチン化レクチンを用いる場合、例えば、商品名：ECLキット (アマシャム バイオサイエンス社製) 等の化学発光基質を用いて発色させ、膜上の糖タンパク質に結合しているレクチンを検出する。

[0032]細胞由来の糖脂質を試料とする場合、クロロホルム、メタノール、水又はこれらの混合溶媒を用いて、細胞から糖脂質を抽出し、得られた糖脂質を薄層クロマトグラフィーで分離した後、直接薄層クロマトグラフ上でレクチンを用いた糖脂質の検出を行なってもよく、あるいは、展開後の薄層クロマトグラフからアイロン若しくはATTO社製の商品名：TLCサーマルプロッター等を用いて糖脂質をPVDF膜に転写し、転写後の膜上の糖脂質を上述した糖タンパク質の場合と同様にレクチンで検出することもできる。

[0033]本発明の分離方法において、例えば、ステップ(b)におけるレクチンによる多能性を有する肝細胞前駆細胞の分離の手段は、特に限定されるものでなく、一般的な細胞分離方法を用いればよい。前記細胞分離方法としては、例えば、フローサイトメトリーによる細胞分画法、磁気ビーズによる細胞分画法、レクチンを結合させた樹脂を用いたレクチンカラムクロマトグラフィーによる分離法が挙げられる。これらの方法の詳細については、例えば最新電気泳動実験法、日本電気泳動学会編集、医歯薬出版株式会社や新細胞工学実験プロトコル、細胞工学 別冊8、秀潤社等に記載されている。

[0034]レクチンフローサイトメトリーについては、例えば、以下のように行なわれうる。材料とする細胞、例えば、肝臓から得られた細胞 (肝臓細胞) をPBSで2回洗

浄する。洗浄後の細胞に、0.02重量% EDTAを含むPBSを添加し、5分ほど放置し、得られた混合物をよく懸濁する。得られた懸濁液を、2000rpmで遠心分離し、上清を除去する。得られた細胞をPBSで洗浄し、PBSに懸濁して、細胞懸濁液を得る。約5 μ g/ml 標識レクチンを細胞懸濁液に混ぜ、適当な温度で適当な時間放置する。レクチンの糖鎖構造に対する特異性は、インキュベーションの温度で変化する事が知られているので、使用するレクチンごとにインキュベーションの温度と時間を適宜設定することが好ましい。レクチンとの反応後、細胞をPBSで3回洗浄する。細胞をPBSに懸濁して得られた試料を、Fluorescence activated cell sorter (FACS) に供し、レクチンで特異的に標識された蛍光強度の強い細胞集団を分画する。前記の操作により、生存可能な肝細胞前記細胞を含有する細胞集団を取得することができる。

[0035]なお、フローサイトメトリーを行なう場合、標識レクチンにおける標識物質は、例えば、フローサイトメーターのレーザー光及びフィルターの種類により、適宜選択されうる。前記標識物質としては、具体的には、例えば、フルオレセイン イソチオシアネート (FITC)、フィコエリスリン (PE)、アロフィコシアニン (APC)、テキサスレッド (TR) 等が挙げられる。

[0036]本発明の多能性を有する肝細胞前駆細胞の同定方法及び分離方法においては、前記のように、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現（存在）する糖鎖に結合する抗体（糖鎖に対する抗体）、例えば、前記レクチンにより認識される糖鎖構造に特異的に結合する抗糖鎖抗体又はその誘導体を用いることもできる。すなわち、本発明の同定方法は、他の実施態様では、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合する抗体を用いて、該糖鎖を検出する。かかる実施態様の同定方法は、具体的には、

(A') 前記「多能性を有する肝細胞前駆細胞を分離するための材料」と、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合する抗体とを接触させるステップ、及び
(B') 前記ステップ(A') で得られた混合物中において、該抗体が結合した細胞を検出するステップ、

を含むプロセスを行ない、該抗体が結合した細胞を、多能性を有する肝細胞前駆細胞として同定する。

[0037]また、本発明の分離方法は、他の実施態様では、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合する抗体を用いて、多能性を有する肝細胞前駆細胞を選択する。かかる実施態様の分離方法は、具体的には、

(a') 前記「多能性を有する肝細胞前駆細胞を分離するための材料」と、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合する抗体とを接触させるステップ、及び

(b') 前記ステップ(a')で得られた混合物中において、該抗体が結合した細胞を選別し、分離するステップ、

を含むプロセスを行ない、該抗体が結合した細胞を、多能性を有する肝細胞前駆細胞として選別する。

[0038]なお、本発明の同定方法及び分離方法に用いられる「糖鎖抗原に特異的に結合する抗体(糖鎖に対する抗体)」は、別の側面では、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現(又は存在)している前記糖鎖には、特異的に結合するが、他の細胞に発現(又は存在)し、かつ多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現(又は存在)しない糖鎖には実質的に結合しない抗体を意味する。

[0039]前記糖鎖に対する抗体は、例えば、本発明に使用されるレクチンによって認識される糖鎖構造を有する糖鎖をそのまま用いて、動物を免疫することにより得られうる。また、糖鎖自体で抗原性が低い場合、好ましくは、前記糖鎖をキャリアタンパク質等に結合させて得られた産物を用いて、動物を免疫するか、あるいは目的の糖鎖を発現している細胞そのものを用いて、動物を免疫することが望ましい。前記キャリアタンパク質として、アルブミン、KLH(キーホールリンペットヘマグルチニン)等のタンパク質、MHCクラスIIペプチド等が用いられる。また、前記キャリアタンパク質として、一般に市販されているマレイミド活性化タンパク質を用いてもよく、市販の適当なリンカーを用いて、キャリアーとなるタンパク質やペプチドと、抗原となる糖鎖、糖ペプチド、糖脂質又はリゾ糖脂質とを結合させて用いてもよい。

なお、本発明に用いられる抗体又はその誘導体の特異性は、例えば、前記多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現（又は存在）する糖鎖と、該糖鎖とは異なる対照物質（例えば、他の糖鎖等）を用い、オクタロニー法により、前記多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現（又は存在）する糖鎖とは反応して、沈降線を示し、対照物質とは反応せず、沈降線を示さないことを、前記多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現（又は存在）する糖鎖に対する特異性があることの指標として評価すること、マトリックスに固定化した抗体若しくはその誘導体又は糖鎖と、該マトリックスに固定化した物質に対応した物質を含む溶液系とを用いた表面プラズモン共鳴法等による反応速度論的解析等により調べられうる。

[0040]本発明の同定方法及び分離方法に用いられる糖鎖抗原に特異的に結合する抗体（糖鎖に対する抗体）は、該糖鎖抗原に特異的に結合する能力を有するものであれば、特に限定はなく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のどちらでもよい。さらに、本発明の同定方法及び分離方法においては、公知技術によって修飾された抗体や抗体の誘導体、例えば、ヒト化抗体、F a b フラグメント、F (a b ')₂ フラグメント、単鎖抗体等を使用することもできる。

[0041]前記抗体は、例えば、1992年、ジョン・ワイリー&サンズ社（J o h n W i l e y & S o n s , I n c . ）発行、ジョン・E・コリガン（J o h n E . C o l i g a n）編集、カレント・プロトコルズ・イン・イムノロジー（C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y）に記載の方法により、容易に作製され得る。また、前記抗体は、遺伝子工学的に作製することもできる。前記抗体は、慣用の方法により精製されうる。さらに、得られた抗体を精製後、ペプチダーゼ等によって処理することにより、抗体の断片が得られる。具体的には、前記 F a b フラグメントは、前記糖鎖に対する抗体、特に、モノクローナル抗体を、パパインで消化することにより得られうる。また、前記 F (a b ')₂ フラグメントは、前記糖鎖に対する抗体、特に、モノクローナル抗体を、ペプシンで消化することにより得られうる。得られた精製抗体又はその誘導体を、酵素標識や蛍光標識して、本発明

の同定方法又は分離方法のために用いることができる。

[0042]本発明の同定方法において、抗糖鎖抗体（糖鎖に対する抗体）により、多能性を有する肝細胞前駆細胞を同定する場合、特に限定されないが、例えば、ウェスタンブロッティング法、抗体カラム法、標識抗体による細胞染色法、標識抗体を用いたフローサイトメトリー等の方法が用いられる。

[0043]本発明の分離方法において、前記抗糖鎖抗体（糖鎖に対する抗体）により、多能性を有する肝細胞前駆細胞を分離する場合、特に限定されないが、一般の細胞分離方法を用いればよい。前記細胞分離方法としては、例えば、抗体を用いた磁気ビーズによる分離法、抗体を結合させた樹脂を用いたアフィニティクロマトグラフィーによる分離法、抗体を固定した抗体マトリックスによる分離法、フローサイトメーターによる分離法等が挙げられる。

[0044]本発明の同定方法において、多能性を有する肝細胞前駆細胞を同定する場合、前記肝細胞前駆細胞に特異的に発現（存在）する糖鎖を合成する糖転移酵素の遺伝子発現、該糖転移酵素タンパク質の発現又は酵素活性レベルを測定してもよい。すなわち、本発明の同定方法は、さらに他の実施態様では、該糖鎖を、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖の合成に関与する酵素の発現を介して、検出する。かかる実施態様において、酵素の発現は、酵素活性の測定、酵素タンパク質量の測定、酵素をコードする遺伝子由来のmRNA量の測定等の手段により検出される。

[0045]前記糖転移酵素としては、例えば、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I I、シアリルトランスフェラーゼ、 α -1, 6フコシルトランスフェラーゼ等が挙げられる。これらの糖転移酵素の遺伝子発現レベル、酵素タンパク質発現レベル、酵素活性レベルの測定は、例えば、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I Iに関しては、ザ ジャーナル オブ バイオケミストリー (The Journal of Biochemistry)、第113巻、第692-698頁(1993年)、シアリルトランスフェラーゼに関しては、ザ ジャーナル オブ バイオケミストリー (The Journal of Biochemist

ry)、第120巻、第1-13頁(1996年)、 α -1, 6フコシルトランスフェラーゼに関しては、ザ ジャーナル オブ バイオケミストリー (The Journal of Biochemistry)、第121巻、第626-632頁(1997年)、あるいはこれらの文献に引用されている文献に記載されている方法を参考にして実施されうる。遺伝子発現レベルについては、各酵素をコードする遺伝子の塩基配列を基に、適切なプローブ及び/又はプライマー対を作製することによって、ノーザンブロットング法やPCR法によって測定することができる。本発明において用いられるプライマーは、例えば、T_m値等、公知配列、核酸の二次構造の形成等を考慮し、プライマーのデザインを支援する慣用のソフトウェア等により作製されうる。また、本発明において用いられるプローブは、前記プライマーと同様に、例えば、T_m値等、公知配列、核酸の二次構造の形成等を考慮し、慣用のソフトウェア等により作製されうる。具体的には、(1) 測定対象の糖転移酵素をコードする核酸の塩基配列とデータベースに登録された公知配列との間において、ホームページアドレス <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>において、一般に利用可能であるBLASTアルゴリズム[Cost to open gap: 5、Cost to extend gap: 2、Penalty for nucleotide mismatch: -3、expect value: 10及び word size: 11の条件]により適切にアライメントし、算出した場合、有意な配列同一性を有しないこと、

(2) 二次構造を形成しにくい配列であること、

(3) プライマー対の場合、鎖長が、好ましくは、50~8ヌクレオチド長であり、より好ましくは、30~12ヌクレオチド長であり、プローブの場合、鎖長が、好ましくは、500~8ヌクレオチド長であり、より好ましくは、100~12ヌクレオチド長であること、

等の任意の条件を満たすプローブ又はプライマー対を選択すればよい。

[0046] 酵素タンパク質発現レベルについては各酵素を認識する抗体を用いてウェスタンブロットング法によって測定することができる。また、酵素活性については、例えば、1996年、秀潤社発行、グライコバイオロジー実験プロトコール、細胞工学

別冊、実験プロトコールシリーズに記載の方法に従って、適切なアクセプター糖鎖とドナー糖ヌクレオチドとを用いて測定することができる。

[0047]本発明の別の側面は、本発明の分離方法により、多能性肝細胞前駆細胞を分離するステップを含む、多能性肝細胞前駆細胞含有組成物の製造方法である。本発明の製造方法によれば、本発明の分離方法を行なうことにより、高い純度の多能性肝細胞前駆細胞含有組成物を製造することができる。また、本発明の製造方法によれば、実質的に均質な多能性肝細胞前駆細胞含有組成物を製造することができるため、細胞移植による組織再生、核酸分子、遺伝子、例えば、治療用遺伝子（例えば、肝臓における代謝に関連する遺伝子、肝臓における恒常性維持に関連する遺伝子、肝臓で合成されるタンパク質（例えば、血漿タンパク質等）をコードする遺伝子等）、それらの誘導体等の *ex vivo* での導入、移植用組織の生産、研究用途等のいずれかへの応用に適した多能性肝細胞前駆細胞含有組成物を供給することができる。

[0048]前記多能性肝細胞前駆細胞含有組成物中に含まれる多能性を有する肝細胞前駆細胞以外の成分としては、特に限定されるものではなく、公知の細胞維持用成分、例えば、生理食塩水、細胞培養用培地、血漿、血清；コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン、グルコサミノグリカン等の細胞外マトリックス等が挙げられる。特に好適には、多能性や肝細胞への分化能を維持した状態で当該肝細胞前駆細胞を増殖又は維持できる成分が使用される。

[0049]本発明の製造方法としては、具体的には、前記分離方法におけるステップ（a）及び（b）を行なう方法、又は前記分離方法におけるステップ（a'）及び（b'）を行なう方法が挙げられる。

[0050]本発明の方法により得られる多能性を有する肝細胞前駆細胞は、前記糖鎖の他、CD49f、CD219、c-kit、CD34、Thy-1、アルブミン、CK19の発現の有無等を指標としてその純度を確認しうる。また、本発明の方法により得られる多能性を有する肝細胞前駆細胞について、例えば、肝管系細胞、肝細胞への分化能を調べ、肝細胞前駆細胞であることを確認することができる。

[0051]また、本発明の方法により得られる多能性を有する肝細胞前駆細胞は、胆管系細胞又は肝細胞への分化誘導に適した条件、例えば、胆管系細胞への分化について、 $1\mu\text{M}$ 5-アザシチジン又は $1\mu\text{M}$ レチノイン酸と、10重量% ウシ胎仔血清との存在下、5重量% CO_2 、 37°C でインキュベーションする条件、肝細胞への分化について、 5ng/ml HGF (hepatocyte growth factor)、 10ng/ml EGF又は 40ng/ml FGF (fibroblast growth factor) 等の成長因子と、10重量% ウシ胎仔血清との存在下、5重量% CO_2 、 37°C でインキュベーションする条件に維持することにより、胆管系細胞のマーカであるCK19遺伝子の発現の増加、肝細胞系細胞のマーカであるAlbumin遺伝子の発現の増加が認められること及び細胞形態を指標として、評価されうる。

[0052]本発明の同定方法又は分離方法により同定又は分離された多能性を有する肝細胞前駆細胞、並びに本発明の製造方法により得られた多能性肝細胞前駆細胞含有組成物の用途としては、肝炎、肝ガン等の治療により切除された肝臓に対する再生医療において、外科的に、又はカテーテル等を使用して、肝細胞前駆細胞を肝臓に投与することができるほか、血管内投与を行なうこともできる。遺伝子治療においても、治療用遺伝子を、本発明の同定方法又は分離方法によって同定又は分離された多能性を有する肝細胞前駆細胞に導入した後、該肝細胞前駆細胞を、同様に肝臓あるいは血管内に投与することによって、肝臓において長期に治療用遺伝子を発現させることが期待できる。

[0053]本発明のさらに別の側面は、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖を標的として、導入対象物を該肝細胞前駆細胞に接触及び／又は導入する、多能性肝細胞前駆細胞の標的化方法である。

[0054]本発明の多能性肝細胞前駆細胞の標的化方法によれば、慣用の薬物送達、遺伝子送達技術において、「多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖」と、「多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に特異的に結合若しくは会合する因子」との間の特異的結合又は特異的会合を利用することにより、肝細胞前駆細胞への薬物送達又は遺伝子

送達を可能にする。

[0055]本発明の多能性肝細胞前駆細胞の標的化方法において、薬物送達を行なう場合、薬物の送達に適した担体に「多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に特異的に結合若しくは会合する因子」を保持させて得られた薬物送達用産物を用いてもよく、薬物の薬理学的性質を発揮する範囲で、該薬物自体に「多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に特異的に結合若しくは会合する因子」を保持させて得られた薬物送達用産物を用いてもよい。また、本発明の多能性肝細胞前駆細胞の標的化方法において、遺伝子送達を行なう場合、導入対象の遺伝子を保持した遺伝子導入用担体（リポソーム等）に「多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に特異的に結合若しくは会合する因子」を保持させて得られた遺伝子送達用産物を用いてもよい。

[0056]さらに、本発明の多能性肝細胞前駆細胞の標的化方法において、遺伝子送達を行なう場合、レトロウイルス結合部位（例えば、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジン等のレトロウイルス結合部位）を含有した機能性物質（ポリペプチド等）Aと「多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に特異的に結合若しくは会合する因子」の糖鎖への結合又は会合に関連する部位を含有した機能性物質（ポリペプチド等）Bとを少なくとも含有した混合物、又は前記機能性物質Aと前記機能性物質Bとを含有した人工基質の存在下に、導入対象の遺伝子を保持したレトロウイルスベクターを用いてもよい。なお、前記混合物又は人工基質には、他の細胞接着性因子をさらに含んでもよい。前記混合物における機能性物質A及び機能性物質Bそれぞれの含有量は、レトロウイルスと機能性物質Aとの結合若しくは会合及び多能性肝細胞前駆細胞と機能性物質Bとの結合若しくは会合に適した有効量であればよい。

[0057]また、前記「多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に特異的に結合若しくは会合する因子」は、前記レクチン、前記糖鎖を認識する抗体等が挙げられる。

[0058]本発明の多能性肝細胞前駆細胞の標的化方法の評価は、例えば、マトリックスに固定化した糖鎖と、薬物送達用産物を含有した溶液、遺伝子送達用産物を含有した溶液又はレトロウイルスベクターと前記混合物若しくは前記人工基質との組み合わせを

含有した溶液とを用いて、表面プラズモン共鳴解析により、糖鎖に対する結合能を調べることにより評価される。

[0059]本発明の多能性肝細胞前駆細胞の標的化方法は、例えば、肝臓における疾患、肝臓の機能低下に伴う疾患等のために、核酸分子、遺伝子、例えば、治療用遺伝子（例えば、肝臓における代謝に関連する遺伝子、肝臓における恒常性維持に関連する遺伝子、肝臓で合成されるタンパク質をコードする遺伝子等）、それらの誘導体等を *ex vivo* で導入する場合に有利である。

[0060]以下、本発明を実施例等により詳細に説明するが、本発明は、かかる実施例等により、何ら限定されるものではない。

[0061]実施例 1

多能性を有する肝細胞前駆細胞株として、NIH の Thorgeirsson 博士から供与された 20 継代前後のラット肝臓上皮 (RLE) 細胞を用いた。対照細胞として、ヒト肝芽腫細胞 Huh6 (JCRB0401、JCRB細胞バンク)、ヒト肝芽腫細胞 Huh7 (JCRB0403、JCRB細胞バンク)、ラット肝ガン細胞 m31 (JCRB0422)、マウスメラノーマ細胞 B16F10 (ATCC CRL-6475)、マウス胎生期肝細胞 BNL-CL (ATCC TIB-73)、マウス胎生期肝ガン細胞 BNL-A7 を用いた。

[0062]前記細胞は、いずれも 10 重量% ウシ胎仔血清 (FCS) と $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシンとを含む培地で、5 体積% CO_2 、 37°C でインキュベーションすることにより培養した。なお、前記培地として、前記 RLE 細胞について、Ham-F12 培地 (ICN biomedical, Inc 製)、前記 Huh6 細胞及び前記 Huh7 細胞について、RPMI-1640 培地 (SIGMA 社製)、前記 m31 細胞、前記 B16F10 細胞、前記 BNL-CL 細胞及び前記 BNL-A7 細胞について、Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) を用いた。

[0063]培養細胞を培養シャーレから回収し、得られた培養細胞を、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で 1 回洗浄した。その後、得られた細胞に、TNE バッファー [1

重量% NP-40 (Nonidet P-40) と 0.15M NaCl と 1mM EDTA と プロテアーゼインヒター (10 μ M aprotinin) とを含む 10mM Tris-HCl, pH 7.8) を加えて、該細胞を可溶化した。

[0064] 可溶化した細胞溶解物のタンパク質 20 μ g に相当する量に、SDS-PAGE 用サンプルバッファー [組成: 10mM Tris-HCl, pH 6.8、2重量% SDS、1重量% 2-メルカプトエタノール、8M 尿素] を添加し、100℃で5分間インキュベーションして、該タンパク質を変性させた。得られた試料を、10重量% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いる電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。泳動終了後、ゲル上の分離されたタンパク質をニトロセルロース膜にブロッティングした。ニトロセルロース膜を 3重量% ウシ血清アルブミン (BSA) 中、室温で一晩ブロッティングした。

[0065] ついで、レクチンを用い、以下のように、前記ニトロセルロース膜上のタンパク質を解析した。前記レクチンとして、ビオチン化レクチン [HONEN CORPORATION 製] を用いた。用いたレクチンは、インゲンマメ (Phaseolus Vulgaris) レクチン E 4 PHA、小麦胚芽レクチン WGA である。

[0066] レクチンを、0.05重量% Tween 20 (商品名) を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS) で 1000 倍に希釈し、得られた溶液中に、ブロッティング後のニトロセルロース膜を浸して 30 分間室温でインキュベーションした。その後、ニトロセルロース膜を、0.05重量% Tween 20 (商品名) を含む TBS で 10 分間 3 回洗浄した。

[0067] また、Peroxidase 標識 avidin [商品名: ABC キット (Vector Laboratories 製) に含まれる試薬] を 0.05重量% Tween 20 (商品名) を含む TBS で 2000 倍に希釈し、得られた溶液中に、洗浄後のニトロセルロース膜を浸して、30 分間室温でインキュベーションした。その後、インキュベーション後の膜を、0.05重量% Tween 20 を含む TBS で 10 分間 3 回洗浄した。洗浄後の膜について、商品名: ECL キット (Amersham Biosciences 社製) を用いて発色させた。

[0068]その結果、多能性を有する肝細胞前駆細胞株であるR L E細胞由来のタンパク質は、肝芽腫細胞や肝癌細胞、胎生期肝細胞由来のものと比較して、E 4 P H Aで非常に強く染色された。したがって、多能性を有する肝細胞前駆細胞株では、E 4 P H Aにより認識される糖鎖が、優勢に(predominantly)又は特異的に、発現していることが示唆される。

[0069]実施例 2

実施例 1 で用いた多能性を有する肝細胞前駆細胞株R L E細胞、並びに対照細胞としてラット腹水肝ガン細胞A H 6 6、灌流直後の肝細胞、4 8 時間培養後の肝細胞及び肝非実質細胞それぞれについて、各種レクチンを用いて、フローサイトメーターによる解析を行なった。なお、前記灌流直後の肝細胞は、慣用のin situ灌流法により、9～12週令のSDラットから得られた肝細胞であり、また、前記48時間培養後の肝細胞及び肝非実質細胞は、in situ灌流法により、9～12週令のSDラットから、肝細胞と肝非実質細胞とを得、得られた肝細胞及び肝非実質細胞を、10重量% FCSと100mg/l カナマイシン (SIGMA 社製) と0.1μM インスリンと10μM dexamethasone (和光純薬工業株式会社製) とを含有したD-MEMを用い、コラーゲンコートディッシュ上、5体積% CO₂、37℃の条件で、3～6時間毎に、新しい培地と交換しながら培養することにより得られた細胞である。

[0070]前記細胞は、いずれも10重量% FCSと50μg/ml カナマイシンとを含む培地を用い、コラーゲンコートディッシュ上で5体積% CO₂、37℃でインキュベーションすることにより培養した。なお、前記培地として、R L E細胞について、Ham-F12培地 (ICN biomedical s, Inc 製)、培養肝細胞について、0.1μM インスリンと10μM デキサメサゾンとを含むD-MEM培地を用いた。

[0071]培養細胞を培養ディッシュから回収し、10mlのPBSで2回洗浄した。得

られた細胞に、1 ml の 0.02 重量% EDTA を含む PBS を添加して 5 分間室温で放置した。その後、得られた細胞をよく懸濁し、得られた懸濁液を、1.5 ml のエッペンドルフチューブに移した。5 μ g/ml FITC 標識レクチンを 100 μ l の PBS に添加し、ついで、得られた溶液と、前記エッペンドルフチューブ中の細胞懸濁液とを混合し、室温で 15 分間インキュベーションを行なった。その後、細胞を、1 ml の PBS で 3 回洗浄し、最終的に 0.5 ml の PBS に懸濁した。得られた細胞懸濁液を、FACS に供した。なお、FITC レクチンによる 480 nm における蛍光強度と、何も染色していないサンプル、すなわち、FITC 標識レクチンを添加していない細胞懸濁液のサンプルの自家発光の蛍光強度との差でレクチンの結合した細胞を定量した。前記レクチンとして、LCA 及び E4 PHA 並びに対照としてタチナタマメレクチン [コンカナバリン A (ConA)] を用いた。

[0072] FITC 標識 E4 PHA を用いた FACS の結果を図 1 に示す。また、FITC 標識 LCA を用いた FACS の結果を図 2 に示す。

[0073] 図 1 に示されるように、多能性を有する肝細胞前駆細胞である RLE 細胞は、対照細胞である肝ガン細胞 AH66、灌流肝細胞、肝非実質細胞と比較して、FITC 標識 E4 PHA によって、より強く染色された。また、図 2 に示されるように、前記 RLE 細胞は肝細胞や肝非実質細胞と比較して、FITC 標識 LCA によっても、より強く染色された。

[0074] さらに、WGA を使用して上記同様の実験を行なった。この結果、RLE 細胞は WGA によっても染色されることが明らかとなった。また、肝非実質細胞、肝癌細胞も WGA と親和性を有していた。

[0075] 実施例 3

細胞表面の糖鎖の違いをレクチンとの結合性で識別することにより、生きたままの状態での細胞の分離を行なった。

[0076] RLE 細胞を、10 ng/ml EGF (epidermal growth

factor) と 1mM nicotinamide との存在下、10 重量% ウシ胎仔血清 (FCS) と 50 μ g/ml カナマイシンとを含む Ham-F12 培地を含む 10 cm ディッシュ中で、37℃、5 体積% CO₂ で、24 時間培養した。細胞が sub-confluent となったディッシュ上の細胞について、トリプシン処理を行ない、細胞 (10⁷ 細胞以上) を回収した。回収した細胞を、PBS で洗浄し、5 ml の PBS に懸濁した。得られた懸濁液に、10 μ g/ml となるように、ビオチン化 E4 PHA を添加して、4℃ で 5 分間、rotation させた。

[0077] 次いで、細胞を PBS で洗浄した後、80 μ l の PBS に懸濁した。得られた細胞懸濁液に、商品名: Streptavidin Microbeads (第一化学薬品株式会社製) 20 μ l を加えて混合し、4℃ で 15 分間インキュベーションした。その後、得られた細胞を、PBS で洗浄し、500 μ l の PBS に懸濁した。得られた細胞懸濁液と、商品名: autoMACS (第一化学薬品株式会社製) とを用いて、E4 PHA に結合した細胞 (RLE 細胞) と E4 PHA に結合していない細胞とを分離した。

[0078] E4 PHA に結合した細胞について、下記実施例 5 に示す試験を行ない、肝管系細胞、肝細胞への分化能を有するものであることを確認した。

[0079] 実施例 4

[0080] RLE 細胞、対照細胞として m31 細胞並びに灌流直後の肝細胞について、E4 PHA レクチンが認識する糖鎖構造 bisected GlcNAc の生成に関する糖転移酵素である GnT-III (N-acetylglucosaminyl transferase-III) の存在を調べた。

[0081] 実施例 1 と同様に、各細胞を可溶化させ、SDS-PAGE 及びニトロセルロース膜へのブロッティングを行なった。その後、一次抗体として、マウス由来の GnT-III に対する抗体 (The Journal of Biochemistry, 第 278 巻、第 25295-25301 頁参照)、二次抗体として、HRP (西洋ワサビパーオキシダーゼ) 標識抗マウス抗体

(Promega社製)を用い、GnT-IIIの検出を行なった。

[0082]この結果、RLE細胞ではGnT-IIIが検出されたが、m31、肝細胞ではGnT-IIIの存在は認められなかった。

[0083]以上の結果より、GnT-IIIの存在を指標として、肝細胞前駆細胞を検出できることが明らかになった。

[0084]実施例5

RLE細胞の分化能を、胆管系細胞又は肝細胞への分化誘導を行なうことにより調べた。

[0085]32継代のRLE細胞を、 $1\mu\text{M}$ 5-azacytidine (SIGMA社製)又は $1\mu\text{M}$ all-trans retinoic acid (SIGMA社製)の存在下、10重量% ウシ胎仔血清 (FCS)と $50\mu\text{g/ml}$ カナマイシンとを含むHam-F12培地 (ICN biomedical s, Inc製)中、5重量% CO_2 、 37°C で、10日間培養した。なお、対照として、32継代のRLE細胞を、 $1\mu\text{M}$ 5-azacytidine (SIGMA社製)又は $1\mu\text{M}$ all-trans retinoic acid (SIGMA社製)の非存在下に、前記と同様に培養した。

[0086]また、24継代のRLE細胞を、成長因子 [5ng/ml HGF (hepatocyte growth factor)、 10ng/ml EGF又は 40ng/ml FGF (fibroblast growth factor)]の存在下、10重量% ウシ胎仔血清 (FCS)と $50\mu\text{g/ml}$ カナマイシンとを含むHam-F12培地 (ICN biomedical s, Inc製)中、5重量% CO_2 、 37°C で、7日間培養した。なお、対照として、24継代のRLE細胞を、前記成長因子の非存在下に、前記と同様に培養した。

[0087]培養後の細胞から、常法により、total RNAを抽出した。得られたtotal RNAを用い、以下のように、RT-PCRを行なった。具体的には、前記to

total RNAと商品名：Reverse Transcription System (Promega社製)とTaKaRa Ex Taq (TAKARA BIO INC)とを用いて、1st strand cDNAの合成を行なった。得られたcDNAを鋳型とし、PCRを行ない、Albumin遺伝子、Cytokeratin 19 (CK19) 遺伝子及び対照として β -actin遺伝子のそれぞれの発現を調べた。前記PCRにおけるプライマー対として、

Albumin遺伝子について、sense primer (GAGAAGGTCACCAAGTGCTGTAGT;配列番号：1)と antisense primer (CTGGGAGTGTGCAGATATCAGAGT;配列番号：2)とのプライマー対、

CK19遺伝子について、sense primer (ACCATGCAGAACCTGAACGAT;配列番号：3)と antisense primer (CACCTCCAGCTCGCCATTAG;配列番号：4)とのプライマー対、

β -actin遺伝子について、sense primer (GAAGATTGGCACCACACTTT;配列番号：5)と antisense primer (TTGAATGTACTTTCATGGAT;配列番号：6)とからなるプライマー対

を用いた。これらのプライマー対により、Albumin遺伝子について、141bp、Cytokeratin 19 (CK19) 遺伝子、83bp、 β -actin遺伝子について、595bpのDNA断片が得られる。また、PCRのサーマルプロファイルは、Albumin遺伝子について、変性：95℃、30秒とアニーリング：70℃、1分と伸長：72℃、1分30秒とを1サイクルとする40サイクル、CK19遺伝子について、変性：95℃、30秒とアニーリング：62℃、1分と伸長：72℃、1分30秒とを1サイクルとする32サイクル、 β -actin遺伝子について、変性：95℃、30秒とアニーリング：55℃、1分と伸長：72℃、1分30秒とを1サイクルとする30サイクルである。得られた増幅産物は、2重量%アガロースゲルで電気泳動により確認した。

[0088] RT-PCRの結果から、レチノイン酸存在下に培養したRLE細胞において、胆管系細胞のマーカーであるCK19遺伝子の発現が高度に上昇していることが明ら

がになった。また、レチノイン酸存在下に培養したRLE細胞において、Albumin遺伝子の発現も少し上昇していた。一方、5-azacytidine存在下に培養したRLE細胞においても、CK19遺伝子発現の弱い上昇が見られた。

[0089]また、各種成長因子存在下で培養したRLE細胞に関して、EGF存在下で培養したRLE細胞において、肝細胞系細胞のマーカーであるAlbumin遺伝子の発現の増加が認められた。これに対し、HGF又はFGF存在下で培養した細胞ではAlbumin遺伝子発現の増加は認められなかった。また、いずれの細胞においてもCK19遺伝子の発現は見られなかった。

[0090]以上の結果より、RLE細胞が、胆管系細胞又は肝細胞に分化しうる前駆細胞であることが明らかとなった。

[0091]配列表フリーテキスト

配列番号：1は、アルブミン遺伝子用センスプライマーの配列である。

[0092]配列番号：2は、アルブミン遺伝子用アンチセンスプライマーの配列である。

[0093]配列番号：3は、CK19遺伝子用センスプライマーの配列である。

[0094]配列番号：4は、CK19遺伝子用アンチセンスプライマーの配列である。

[0095]配列番号：5は、 β -アクチン遺伝子用センスプライマーの配列である。

[0096]配列番号：6は、 β -アクチン遺伝子用アンチセンスプライマーの配列である。

[0097]均等物

本発明は、その精神又は主要な特徴から逸脱することなく、他の種々の形で実施することができる。そのため、前述の実施例は、あらゆる点で単なる例示にすぎず、限定的に解釈してはならない。本発明の範囲は、特許請求の範囲によって示すものであり、明細書本文には、なんら拘束されない。さらに特許請求の範囲の均等範囲に属する変形や変更は、すべて本発明の範囲内である。

請求の範囲

1. 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖を検出する、多能性を有する肝細胞前駆細胞の同定方法。
2. 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合するタンパク質を用いて、該糖鎖を検出する、請求項1記載の方法。
3. 該タンパク質が、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合するレクチンである、請求項2記載の方法。
4. 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖が、インゲンマメレクチン、小麦胚レクチン、レンズマメレクチン及びヒイロチャワンタケレクチンからなる群より選択された少なくとも1つのレクチンによって認識される糖鎖構造を含むものである、請求項1記載の方法。
5. 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合する抗体を用いて、該糖鎖を検出する、請求項1記載の方法。
6. 該糖鎖を、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖の合成に関与する酵素の発現を介して、検出する、請求項1記載の方法。
7. 酵素の発現が、酵素活性の測定、酵素タンパク質量の測定及び酵素をコードする遺伝子由来のmRNA量の測定からなる群より選択された少なくとも1つの手段により検出される、請求項6記載の方法。

8. 該酵素が、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I I、シアリルトランスフェラーゼ又は α -1, 6フコシルトランスフェラーゼである、請求項6記載の方法。

9. 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖を指標として、多能性を有する肝細胞前駆細胞を選択する、多能性を有する肝細胞前駆細胞の分離方法。

10. 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合するタンパク質を用いて、多能性を有する肝細胞前駆細胞を選択する、請求項9記載の方法。

11. 該タンパク質が、多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合するレクチンである、請求項10記載の方法。

12. 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖が、インゲンマメレクチン、小麦胚レクチン、レンズマメレクチン及びヒイロチャワンタケレクチンからなる群より選択された少なくとも1つのレクチンによって認識される糖鎖構造を含む、請求項10記載の方法。

13. 多能性を有する肝細胞前駆細胞に発現する糖鎖に結合する抗体を用いて、多能性を有する肝細胞前駆細胞を選択する、請求項9記載の方法。

14. 請求項9～13いずれか1項に記載の方法により、多能性肝細胞前駆細胞を分離するステップを含む、多能性肝細胞前駆細胞含有組成物の製造方法。

要約書

本発明は、多能性を有する肝細胞前駆細胞の同定方法、該多能性を有する肝細胞前駆細胞の分離方法及び該多能性肝細胞前駆細胞の製造方法に関する。